

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08073498 A**

(43) Date of publication of application: **19.03.96**

(51) Int. Cl

C07K 14/47
C07K 1/02
C07K 1/10
C07K 14/48
// A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/00

(21) Application number: **06209613**

(22) Date of filing: **02.09.94**

(71) Applicant:

MITSUI TOATSU CHEM INC
MURAMATSU TAKASHI

(72) Inventor:

KIMURA AKITOSHI
SAKAKIBARA SHUNPEI
MURAMATSU TAKASHI
MURAMATSU TOSHIKO
AWAYA AKIRA

(54) PRODUCTION OF POLYPEPTIDE

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a polypeptide, having inducing activities for plasminogen activators and useful for prevention or treatment, etc., of cardiac infarction and thrombosis by producing an N-half fragment and a C-half fragment of a human midkine polypeptide and then coupling both the fragments.

CONSTITUTION: This method for producing a human midkine (MK) polypeptide comprises dividedly synthesizing a peptide comprising 121 amino acids into 13 fragments (1-11), (12-22), (23-31), (32-40), (41-51), (52-59), (60-70), (71-77), (78-83), (84-93), (94-103), (104-112) and (113-121) in chemically synthesizing the human MK polypeptide according to a liquid-phase synthetic method, dividing the resultant 13 fragments into two groups of the N side and C side, individually producing an N-half (1-59) fragment and a C-half

(60-121) fragment and coupling both the fragments. The resultant polypeptide has neurite extending actions, inducing activities for plasminogen activators and heparin binding activities and is useful for prevention and treatment, etc., of cardiac infarction, thrombosis, etc.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-73498

(43)公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int.Cl.⁶
C 07 K 14/47
1/02
1/10

識別記号 庁内整理番号
8318-4H

FL

技術表示箇所

A61K 37/02

AAA

A B S

審査請求 未請求 請求項の数 2 OL (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-209613

(71) 出願人 000003126

三井東圧化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(22)出願日 平成6年(1994)9月2日

(71)出願人 591038945

村松 番

愛知県名古屋市天白区天白町大字島田字黒石3785-3391 シティコーポしまだ B-205

(72) 発明者 木村 ▲皓▼俊

兵庫県西宮市苦楽園三番町10-6

(72) 発明者 ▲糖▼原 俊平

大阪府吹田市藤白台2丁目23番3号

(74) 代理人 弁理士 羅林 宏

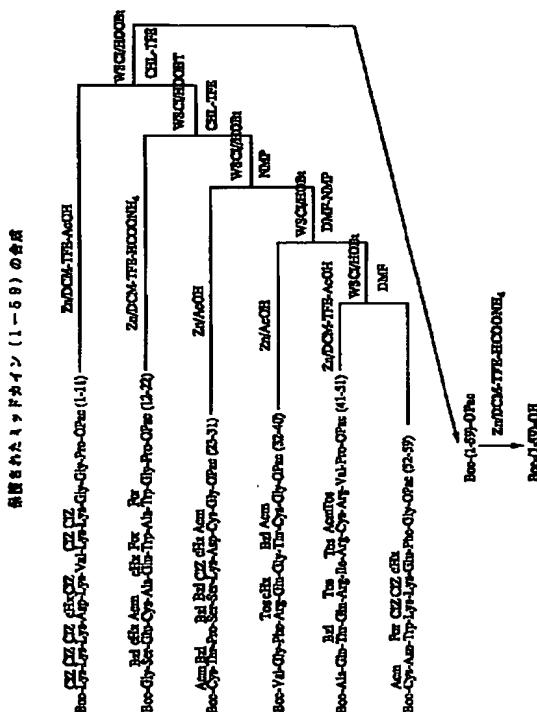
最終頁に鏡く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドの製造法

(57) 【要約】

【目的】 ヒトミッドカインの化学合成

【構成】 ミッドカインのC-halfとN-halfをカップリングさせる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトミッドカイン(MK)ポリペプチドを化学合成するにあたって、N-half(1-59)断片とC-half(60-121)断片とを個々に製造して、かかる後に両断片をカップリングさせることを特徴とするヒトMKポリペプチドの製造法。

【請求項2】ヒトブレイオトロフィンポリペプチドのC-half(67-109)断片の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はミッドカインファミリーに属するポリペプチド、特にヒトミッドカイン(MK)ポリペプチドおよびそのペプチド断片、並びにヒトブレイオトロフィン(PTN)ポリペプチドのペプチド断片の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】本発明者らは先に、レチノイン酸支配下において、細胞の分化・増殖をコントロールする因子として、マウス由来MKポリペプチド(Kadomatsu, K., et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. (BBRC), 151, 1312 (1988) およびTomomura, M., et al. : J. Biol. Chem., 265, 10765 (1990)) およびヒト由来MKポリペプチド(特開平5-91880)を見出してきた。

【0003】そしてMKが神経細胞の生存および神経突起伸長の2つの活性を持つ神経栄養因子であること、またMKが発癌、アルツハイマー病発症とのかかわりがあることがその後の研究により明らかにされた(村松喬:レチノイン酸応答性のペパリン結合性成長因子、ミッドカイン(MK)-発生分化、がん、神経とのかかわりで-;生化学第65巻第12号、1494~1504頁、1993年12月。特開平6-172218)。

【0004】またMKに引き続いてMKと50%のアミノ酸相同性を有するheparin binding growth associated molecule(HB-GAM)(Merrenmies, J. & Rauvala, H. : J. Biol. Chem., 265, 16721-16724, (1990))あるいはブレイオトロビン、pleiotrophin(PTN)(Li, Y. -S., Milner, P. G., Ghauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J., & Deuel, T. F. : Science, 250, 1690-1694, (1990))、またMKと65%のアミノ酸相同性を有するretinoic acid-induced heparin binding protein(RI-HB)(Urios et al., BBRC, 175, 617-624 (1991))と呼ばれる分子が発見さ

れ、MKファミリーポリペプチド(蛋白質)に属するものであることが、わかつてき。HB-GAM/PTNは神経突起伸長作用を持つ他、内皮細胞の増殖刺激作用を有することが報告されている(Rauvala, H., EMBO J., 8, 2933-2941 (1989), Wellenstein, A. et al., J. Biol. Chem., 267, 2582-2587 (1992), Courty, J. et al. BBRC, 180, 145-151 (1990))。

10 【0005】本発明者らはまたMKポリペプチド、PTNポリペプチドなどMKファミリーに属するポリペプチドなどを有効成分とする、心筋梗塞、血栓等の予防・治療剤を提供した(特願平6-171377)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】MKファミリーポリペプチドを医薬、診断薬、試薬として使用する際には、純度の高い原末を大量に調製することが必要である。そのためには大腸菌、酵母などにおいて組み換えDNAを用いた遺伝子工学的手法で、MK、PTNを製造するこ

20 ができる。一方、MKファミリーポリペプチドを化学的に、あるいは一部酵素合成法を併用して、全化学合成することも考えうるが、実際に実施され成功したという報告はこれまでになく、MKポリペプチドの全化学合成法の確立が期待されていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】今日、ペプチドを合成するためには、非常に多くの方法が知られている。特に固相法という便利な方法があり、それを使えば殆どどんなペプチドでも合成できるのは事実である。しかし合成す

30 べきペプチドの分子量が大きくなりアミノ酸数が100個以上のポリペプチド、蛋白質の場合、これらを純粋な型で合成するのはいくら固相法による合成技術が発達したとはいえ、非常な困難を伴なうのは周知のとおりである。

【0008】固相法では、各アミノ酸の縮合反応を自動的に進行させることができるために、ペプチド鎖の延長に要する時間を大幅に短縮することができる。しかし一方で中間体を精製することが出来ないため、合成途上に生成した副生物はすべて最終生成物中に混入するという理論的な欠点をもっている。

【0009】その意味から蛋白質のように分子量の大きいものを合成する場合に、副生物の生成を抑えようと思えばやはり液相法によるセグメント縮合法で目的物を注意深く合成するのが理想的である。その場合、それぞれのセグメントは構成アミノ酸10個前後になるように分割して合成し、それを十分に精製したのち適当な溶媒中で注意深く縮合させる必要がある。

【0010】これらの方法で蛋白質を合成するためにはさらにいくつかの条件を満たす必要がある。第一は各セグメントにある全ての官能基を保護しながら、C末端に

あるカルボン酸の保護基のみを遊離させることである。第二はC末端の遊離カルボキシル基とアミン成分の遊離アミノ基とをラセミ化させることなく、縮合させる技術を確立することである。最後に重要なことは、各セグメントをよく溶かし、しかもうまく反応させうるような溶媒系を見いだすことである。

【0011】これらの条件を満たすものとして、C末端のカルボン酸の保護基としてフェナシルエステル(Pac)の使用と各セグメント合成に適当な溶媒中、例えばDMF, HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)の存在下にて水溶液カルボジイミド(WSCI)を用いる縮合法がある。このようにセグメント合成が終了したのち各セグメントは遊離のカルボン酸に導く必要があるが、その時にもそれらセグメントを溶かす適当な溶媒が必要になる。もしそのセグメントが酢酸によく溶けるのであれば問題ないが、溶けない場合に有効な溶媒としてジクロルメタンとトリフルオロエタノールの混合溶媒(3:1)が良い。そしてこの溶媒中ギ酸アンモニウム(30当量)と亜鉛末(50eq)を用いて室温中反応すればC末端のフェナシルエステルは容易に切断され、目的とする遊離のカルボン酸をもったセグメントが得られる。最後に各セグメントどうしの縮合には溶解度に問題がない場合は、DMFやNMP(N-メチルピロリドン中、カルボキシル成分のC末端がグリシンやプロリンの時は、HOBt存在下WSCI、それ以外の場合は、HOObt(3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン)存在下、WSCIによる縮合が良い。

【0012】一方、溶解度が悪いセグメントの縮合には、クロロホルムとトリフルオロエタノールの混合溶媒(3:1)中HOObt存在下WSCIで縮合させることができる。このようにして合成した保護基のついたペプチドは、無水フッ化水素(HF)でシステインの保護基として用いたAcm(アセトアミドメチル)基以外の全ての保護基を除去してAcm基のついた遊離ペプチドとすることができます。残りのAc m基は酢酸第二水銀を用いて50%酢酸中室温で処理することにより遊離システインを含むペプチドが得られる。この全ての保護基が除去されたペプチドを適当なBu f f e r中で環化反応を行なうことにより目的とする複数のジスルフィド結合を有するポリペプチドが得られる。

【0013】以上の方法を用いて実施例に示すようなヒトMKの全合成を行なうことができた。

【0014】ヒトMKの全合成にあたり、各セグメントの合成は問題なく行なうことが出来たが、セグメントのC末端フェナシル基の脱離の際セグメント、特に84-93, 60-70, 41-51, 12-22および1-11が酢酸に全く溶けなかった。しかしこれらは上記の混合溶媒(シクロルメタン/トリフルオロエタノール)を用いることにより容易に溶解し、その後の脱フェナシ

ル化反応も容易に行なうことができた。

【0015】N-hal f(1-55)およびC-hal f(60-121)の合成は各セグメントをC端より順次縮合させることにより行なった。しかしこの縮合反応の際にも溶解度に問題が生じた。84-93と94-121あるいは12-22と23-59の縮合時これらは非常に難溶となったため、混合溶媒(クロロホルム/トリフルオロエタノール)の使用が不可欠となった。よってそれ以後の縮合は全て混合溶媒を使用して行なつ

10 た。最終の1-59と60-121の縮合も同様最も溶解力の強いDMSO(ジメチルスルホキシド)にも不溶であったが上記混合溶媒を用いることにより容易に縮合反応を行なうことができた。

【0016】得られた保護基のついたN-hal f(1-59)、C-hal f(60-121)およびヒトミッドカイン(1-121)を常法どおりHF処理しそれぞれ(6Ac m)、(4Ac m)、(10Ac m)の入ったペプチドとした。これらを酢酸水銀処理して、Ac m基を除去したのちジスルフィド結合形式反応に供し

20 た。この反応には種々の条件検討を行なったところ、1mM EDTA、2M(NH₄)₂SO₄存在の50mM酢酸アンモニウム(pH7.7)のBu f f e r中で酸化還元型のグルタチオンをペプチドに対して1:10:100の割合で加え5℃で行なうことが至適条件となることが分った。以上のようにN-hal f、C-hal fヒトMKの合成を行なうことができた。同様にして、C-hal f PTNペプチド断片も合成することができた。

【0017】このようにして全化学合成したヒトMK 30 は、天然由来の本発明者が別途調製したMKと、神経突起伸展作用、プラスミノーゲンアクチベーター誘導活性、ヘパリン結合活性などの生物活性において、同等の活性を有することが明らかにされた。またMK、PTNなどのそれぞれC-hal f断片ペプチドにこれら生物活性が局在していることも示された。

【0018】以下本発明を実施例、実験例をもって、更に具体的に説明するが、もとより本発明はこれら記載に限られるものではない。

【0019】

【実施例】

実施例1

ヒト型h-Midkineの合成

保護ペプチド(1-121)の合成はアミノ酸121個からなるペプチドを液相法にて図1および図2に示すように、13個のフラグメント(1-11)(12-22)(23-31)(32-40)(41-51)(52-59)(60-70)(71-77)(78-83)(84-93)(94-103)(104-112)(113-121)に分割、合成した。各フラグメントの純度はTLC, HPLC, アミノ酸分析により確

認した。この後N-hal (1-59) [hMK-Nと略す。]とC-hal (60-121 [hMK-Cと略す。])を合成するべくそれぞれC末から順次縮合した。各フラグメントの合成およびフラグメント縮合には全てWSCl/HOBt法またはWSCl/HOOBt法を用いた。(WSCl: 1-ethyl-3, (3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, HOBt: 1-hydroxybenzotriazole, HOOBt: 3, 4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1, 2, 3-benzotriazine)。

【0020】アミノ酸のN末はBoc基で保護し、アミノ酸側鎖保護基にはそれぞれAsp (OcHex), Glu (OcHex), Ser (Bz1), Thr (Bz1), Lys (C1Z), Arg (Tos), Tyr (BrZ), Trp (For)、そしてCysの保護基にはAcm基を用いた。その他C末保護基にはBz1基、各フラグメントのC末にはPac基を用いて合成した。(CHex: cyclohexyl), (Bz1: benzyl), (C1Z: z-chlorobenzyl oxy carbonyl), (Tos: sulfonyl), (BrZ: 2-bromobenzyl oxy carbonyl), For (formyl), Acm (acetamido methyl), (Pac: Phenacyl ester)。

【0021】保護ペプチド(1-121) 3gをHig h-HF (HF/Anisol=9/1, 0~-5°C, 1h)で次いでLow-HF (HF/Butanedioil=7/3, 0~-5°C, 30min)で処理し1.9gの粗製品を得た。この粗製品1.9gをHPLC逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度10%から60%までの110分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。

【0022】CH₃CN濃度30-32.2%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥して420mgのペプチドを得た。この420mgのペプチドをCMセルロースのイオン交換クロマトグラフィー (3.7×17cm)に注入し starting buffer 0.2M_{AcONH₄}+3Murea (pH5)、limiting buffer 0.7M_{AcONH₄}+3Murea (pH6)各1.25Lの単一濃度勾配条件で溶出した。15gずつ分画し0.48-0.53M塩濃度画分 (56本目から65本目)を集め溶液のpHを酢酸で下げ、そのまま逆相カラム (YMC-ODS, 30×250mm)に注入した。

【0023】前述同様溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN

濃度14%から44%までの110分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度28.5-29.2%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥して125mgの10Acmペプチドを得た。

【0024】このうち90mgを0.5mMペプチド濃度になるように50%AcOHで溶かし、暗所でAcm基に対して1.1当量のHg (OAc)₂を加え窒素雰囲気下室温で2時間かき混ぜた。その後Acm基に対して30当量の2-Mercaptoethanolを加えさらに2時間かき混ぜた。反応液をG-25のゲルろ過クロマトグラム (1.15×73cm)に注入し、5%AcOHで溶出した後ペプチドの部分を集め凍結乾燥してSHペプチド6.5mgを得た。

【0025】SHペプチド45mg (3.4μM)を1mM EDTAと2M (NH₄)₂SO₄およびGSH/GSSG (100/10)を含んだ50mM_{AcONH₄} (pH7.7)の緩衝液、3.4L (1×10⁻⁶M Conc.)に溶かし5°Cで4日間かき混ぜた。TFAでpHを3とした後、逆相のカラム (YMC-C4, 20×250mm)に注入し、HPLC逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×250mm)で分取した。

【0026】溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度15%から35%までの120分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度29.4-29.8%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥して5mgのペプチドを得た。

【0027】SS結合架橋様式は、トリプシン消化後逆相HPLCで分取した各ピークについて質量分析およびアミノ酸分析により、天然型と同じであることを確認した。最終品の純度に関して逆相HPLCのみならずキャピラリー電気泳動の検査でもシングルピークを与えた。

【0028】またアミノ酸分析値および質量分析値も理論値と良く一致した。hMKはODSカラム (4.6×150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度10%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は50°Cで溶出すると14.3minに溶出した。

【0029】質量分析値: 13241.2 [M⁺H]
アミノ酸分析値: Asp 7.52 (8), Thr 9.51 (10), Ser 2.86 (3), Glu 11.12 (11), Gly 16.00 (16), Ala 10.73 (10), Cys 9.17 (10), Val 14.87 (5), Ile 1.83 (2), Leu 1.02 (1), Tyr 2.01 (2), Phe 3.01 (3), Lys 23.32 (23), Trp 3.86 (4), Arg 6.90 (7), Pro 5.98

50

(6)。

【0030】実施例2

hMK-N (N-ha1f) の合成

hMK同様保護ペプチド500mgをHigh-HF、およびLow-HF処理し粗製品340mgを得た。340mg全量をCMセルロースのイオン交換クロマトグラフィー(1.3×9.5cm)に注入し、starting buffer 0.2M AcONH₄ (pH 5)、limiting buffer 1.0M AcONH₄ (pH 6) 各600mlの単一濃度勾配条件で溶出した。

【0031】15gずつ分画し0.34-0.38M塩濃度画分(14本目から18本目)を集め溶液のpHをTFAで下げそのまま逆相カラム(YMC-ODS, 30×250mm)に注入した。0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度15%から45%までの110分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度28.1-28.9%の分画を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して70mgの6Acmmペプチドを得た。

【0032】hMK同様Acmmペプチド50mgを50%AcOHで0.5mMペプチド濃度になるように溶かし、暗所でAcmm基に対して1.1当量のHg(OAc)₂を加え窒素雰囲気下室温で2時間、その後Acmm基に対して30当量の2-Mercaptoethanolを加えさらに2時間かき混ぜ、G-25のゲルろ過クロマトグラフィー(1.15×73cm, 5%AcOHで溶出)後ペプチドの部分を集め凍結乾燥してSHペプチド40mgを得た。

【0033】SHペプチド40mg(6.18μM)を、1mM EDTAと2M(NH₄)₂SO₄およびGSH/GSSG(100/10)を含んだ50mM AcONH₄ (pH 7.7)の緩衝液618ml(1×10⁻⁵M conc.)に溶かし室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後逆相のカラムHPLC逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30×250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度10%から40%までの120分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度29.1-25.5%の画分を集め減圧濃縮後凍結乾燥してhMK-N 15mgを得た。

【0034】hMK-NはODSカラム(4.6×150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度10%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は50℃で溶出すると13.9minに溶出した。純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じてを行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであ

り、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

【0035】質量分析値: 6470.4 [M⁺ H]

アミノ酸分析値: Asp 2.70 (3), Thr 2.88 (3), Ser 2.81 (3), Glu 6.08 (6), Gly 9.00 (9), Ala 3.16 (3), Cys 5.83 (6), Val 2.91 (3), Ile 0.94 (1), Phe 2.24 (2), Lys 9.26 (9), Trp 2.78 (3), Arg 4.00 (4), Pro 4.08 (4)。

【0036】実施例3

hMK-C (C-ha1f) の合成

hMK同様保護ペプチド500mgをHigh-HFおよびLow-HF処理し粗製品340mgを得た。340mg全量をCMセルロースのイオン交換クロマトグラフィー(1.3×9.5cm)に注入し、starting buffer 0.2M AcONH₄ + 3M Urea (pH 5), limiting buffer 1.0M AcONH₄ + 3M Urea (pH 6) 各800mlの単一濃度勾配条件で溶出した。

【0037】20gずつ分画し0.38-0.42M塩濃度画分(38本目から42本目)を集め、溶液のpHをTFAで下げそのまま逆相カラム(YMC-ODS, 30×250mm)に注入した。0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度15%から25%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度22.0-24.5%の分画を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して110mgの4Acmmペプチドを得た。

【0038】hMK同様Acmmペプチド110mgを50%AcOHで0.5mMペプチド濃度になるように溶かし、暗所でAcmm基に対して1.1当量のHg(OAc)₂を加え、窒素雰囲気下室温で2時間、その後Acmm基に対して30当量の2-Mercaptoethanolを加えさらに2時間かき混ぜ、G-25のゲルろ過クロマトグラフィー(1.15×73cm, 5%AcOHで溶出)後ペプチドの部分を集め凍結乾燥してSHペプチド65mgを得た。

【0039】SHペプチド65mg(9.6μM)を、1mM EDTAと2M(NH₄)₂SO₄およびGSH/GSSG(100/10)を含んだ50mM AcONH₄ (pH 7.7)の緩衝液960ml(1×10⁻⁵M conc.)に溶かし室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後逆相クロマトグラフィー(YMC-ODSカラム、30×250mm)で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度12%から22%まで

の60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度25.1-25.5%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して45mgのペプチドを得た。

【0040】hMK-CはODSカラム、(4.6×150mm)で溶離液に0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度10%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は50℃で溶出すると13.5minに溶出した。純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

【0041】質量分析値；6789.9 [M⁺H]
アミノ酸分析値；Asp 4.71 (5), Thr 6.59 (6), Glu 5.04 (5), Gly 7.00 (7), Ala 7.26 (7), Cys 3.80 (4), Val 1.97 (2), Ile 0.88 (1), Leu 0.96 (1), Tyr 1.92 (2), Phe 0.99 (1), Lys 14.00 (14), Trp 0.87 (1), Arg 2.86 (3), Pro 1.86 (2)。

【0042】実施例4

hMK (62-104) (C-half) の合成
固相合成法 (Boc strategy) で合成したhMK (62-104) 樹脂 (Cysの保護基に4MeBz1を用いた以外は同じ保護基を使用した。保護ペプチド樹脂1.7gをHF/p-Cresol/BDT=8.0/5/15で0~-5℃、1h処理し、得られた粗製品700mgを逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×250mm) で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度15%から35%までの10.0分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度25.3-26.8%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥して60mgのSHペプチドを得た。

【0043】SHペプチド60mg (12.3μM) を、1mM EDTAと2M (NH₄)₂SO₄およびGSH/GSSG (100/10) を含んだ50mMAcONH₄ (pH 7.7) の緩衝液1.23L (1×10⁻⁵M Concent.) に溶かし、室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後、逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×250mm) で分取した。溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度5%から40%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。

【0044】CH₃CN濃度30.3-30.6%の画

分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥してhMK (62-104) 30mgを得た。hMK (62-104) はODSカラム (4.6×150mm) で溶離液に0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用いCH₃CN濃度1%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は室温で溶出すると18.5minに溶出した。

【0045】純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

【0046】質量分析値；4836.2 [M⁺H]
アミノ酸分析値；Asp 2.70 (3), Thr 4.62 (5), Glu 5.22 (5), Gly 4.93 (5), Ala 3.17 (3), Cys 3.49 (4), Val 1.96 (2), Ile 0.88 (1), Leu 1.05 (1), Tyr 1.98 (2), Phe 0.98 (1), Lys 6.11 (6), Trp 0.86 (1), Arg 3.00 (3), Pro 0.99 (1)。

【0047】実施例5

hMK (104-121) の合成

hMKのフラグメント (104-112) と (113-121) を縮合させて合成した保護ペプチド100mgをHF/Anisole=9/1で0~-5℃、1h処理し、得られた粗製品80mgを逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×25mm) で分取した。

【0048】溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度3%から18%までの60分単一濃度勾配法、流速20ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度10.25-11.25%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥してhMK (104-121) 60mgを得た。

【0049】hMK (104-121) ODSカラム (4.6×150mm) で溶離液に0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度1%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1ml/min、カラム温度は室温で溶出すると10.9minに溶出した。純度に関して逆相HPLCでシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

【0050】質量分析値；1960.4 [M⁺H]
アミノ酸分析値；Asp 1.00 (1), Thr 2.00 (2), Gly 1.98 (2), Ala 3.01 (3), Cys 0.68 (1), Lys 8.06 (8), Pro 0.99 (1)。

【0051】実施例6

ヒト型h-pleiotropin (67-109) の合成

固相合成法 (Boc strategy) で合成したhPTN (67-109) 樹脂 (Cysの保護基に4MeBzl、Hisの保護基にBomを用いた以外は同じ保護基を使用した) 1.5 gにCys 30当量を加え、H F/p-Cresol/BDT=80/5/15で0~-5°C、1 h処理し、得られた粗製品1.57 g (Cysを含む) を逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×250 mm) で分取した。

【0052】溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度15%から35%までの100分単一濃度勾配法、流速2.0 ml/min、カラム温度は室温で溶出した。CH₃CN濃度24.5~25.6%の画分を集め、減圧濃縮後凍結乾燥してSHペプチド50 mgを得た。

【0053】SHペプチド50 mg (12.3 μM) を、1 mM EDTAと2 M (NH₄)₂SO₄およびGSH/GSSG (100/10) を含んだ50 mM AcONH₄ (pH 7.7) の緩衝液1.23 L (1×10⁻⁴M Concent.) に溶かし室温で一晩かき混ぜた。TFAでpHを3とした後、逆相クロマトグラフィー (YMC-ODSカラム、30×250 mm) で分取した。

【0054】溶離液には0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度5%から40%までの60分単一濃度勾配法、流速2.0 ml/min、カラム温度は室温で溶出した。

【0055】CH₃CN濃度28.5~29.3%の画分を集め減圧濃縮後、凍結乾燥してhPTN (67-109) 30 mgを得た。hPTN (67-109) はODSカラム (4.6×150 mm) で溶離液に0.1%TFAを含むCH₃CN溶液と0.1%TFA水を用い、CH₃CN濃度1%から40%までの25分単一濃度勾配法、流速1 ml/min、カラム温度は室温で溶出すると17.3 minに溶出した。

【0056】純度およびSS結合架橋様式はhMKの検査に準じて行い、SS結合架橋様式が天然型と同じであり、逆相およびキャピラリー電気泳動でシングルピークであることを確認した。またアミノ酸分析値、質量分析値も理論値に良く一致した。

【0057】質量分析値；4840.5 [M·H]⁺

アミノ酸分析値；Asp 2.98 (3), Thr 4.7 *

* 5 (5), Ser 1.87 (2), Glu 5.10
(5), Gly 2.00 (2), Ala 4.06
(4), Cys 3.60 (4), Val 0.97
(1), Ile 0.91 (1), Leu 3.95
(4), Tyr 0.96 (1), Phe 0.98
(1), His 0.97 (1), Lys 5.10
(5), Trp 0.85 (1), Arg 1.98
(2), Pro 0.97 (1)。

【0058】実験例1 細胞内PA活性測定

10 ウシ大動脈由来血管内皮細胞を10%ウシ血清 (BSA) を含むαMEM内に分離し、培養した。96穴培養プレートに細胞をまきコンフルエントになるまで培養後、pH 7.4のリン酸緩衝生食液 (PBS) で洗い、0.1%BSAを含む100 μlの無血清αMEM (αMEM-BSA) 中で培養を行った。

【0059】この100 μlの培地中に種々の濃度のMKポリペプチドや断片ペプチドまた対照のレチノールを添加し、それら薬剤によるPA生産・誘導能を測定した。各培養時間ごとに、培養上清をアスピレートし、培養細胞をPBSで洗い、細胞内PAを0.5% Triton X-100を含む0.1Mトリス-HCl (pH 8.1) 緩衝液100 μl中に抽出し、抽出液中のPAレベルは¹²⁵I-ラベルフィブリンプレート (Cross, J. L. et al., J. Cell Bio 11, 95, 974-981 (1982)) を用いて測定した。

【0060】PA活性はサンプル中のmgタンパクあたりのUK単位 (U) で表わした。蛋白濃度はBSAを標準として、マイクロタイタープレートBCA (Pierce, Rockford, IL, USA) により測定した。18時間培養後、未添加の対照に対してレチノール2 μMの添加で1.5倍のPA活性レベルとなった。

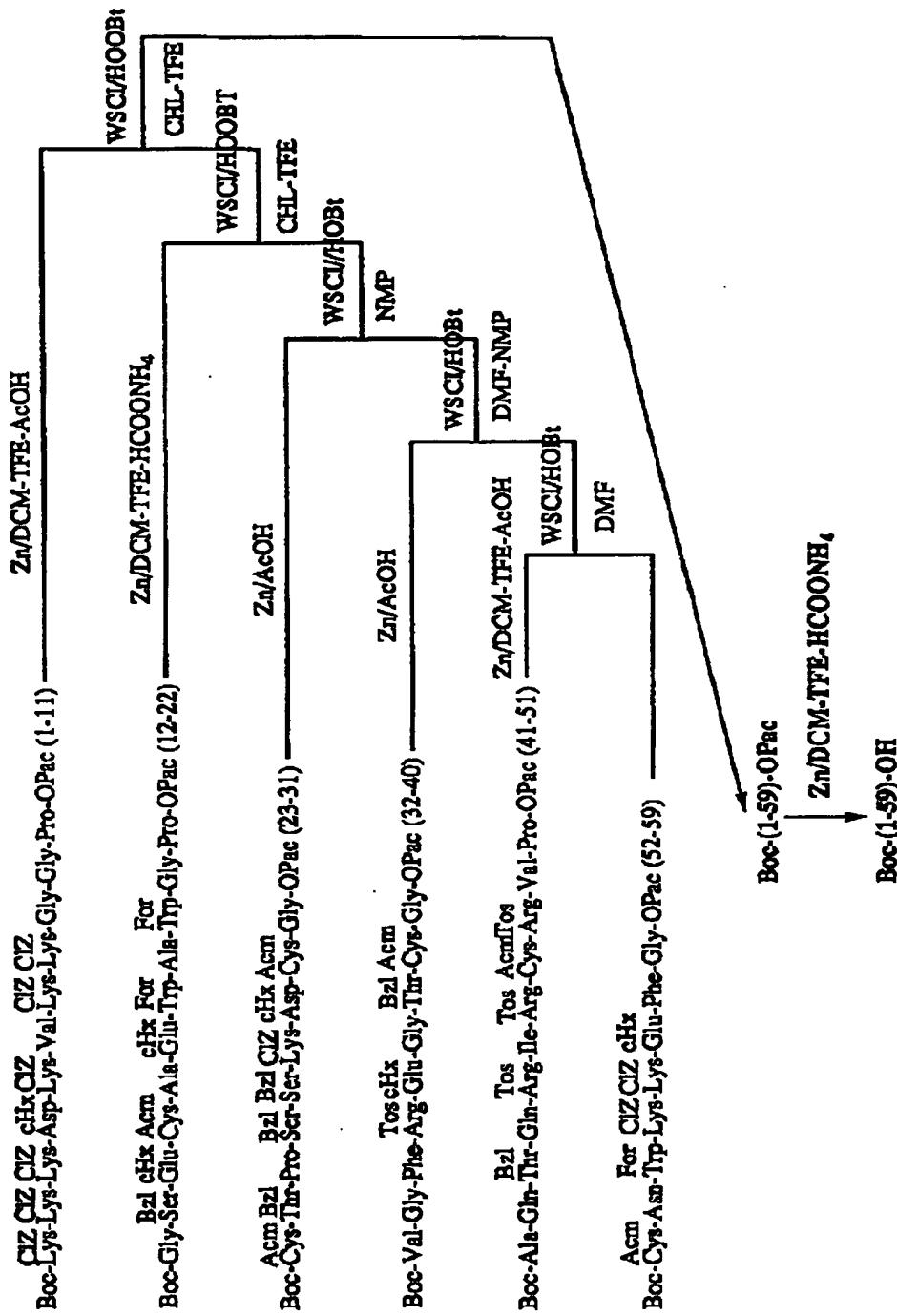
【0061】レコンビナントMK、化学合成MK、C-half MKなどは10~100 ng/mlの濃度で、対照に比べて、3倍から15倍のPA活性が見られた。他方MK自身はプラスミン活性を持たないことがわかった。

【図面の簡単な説明】

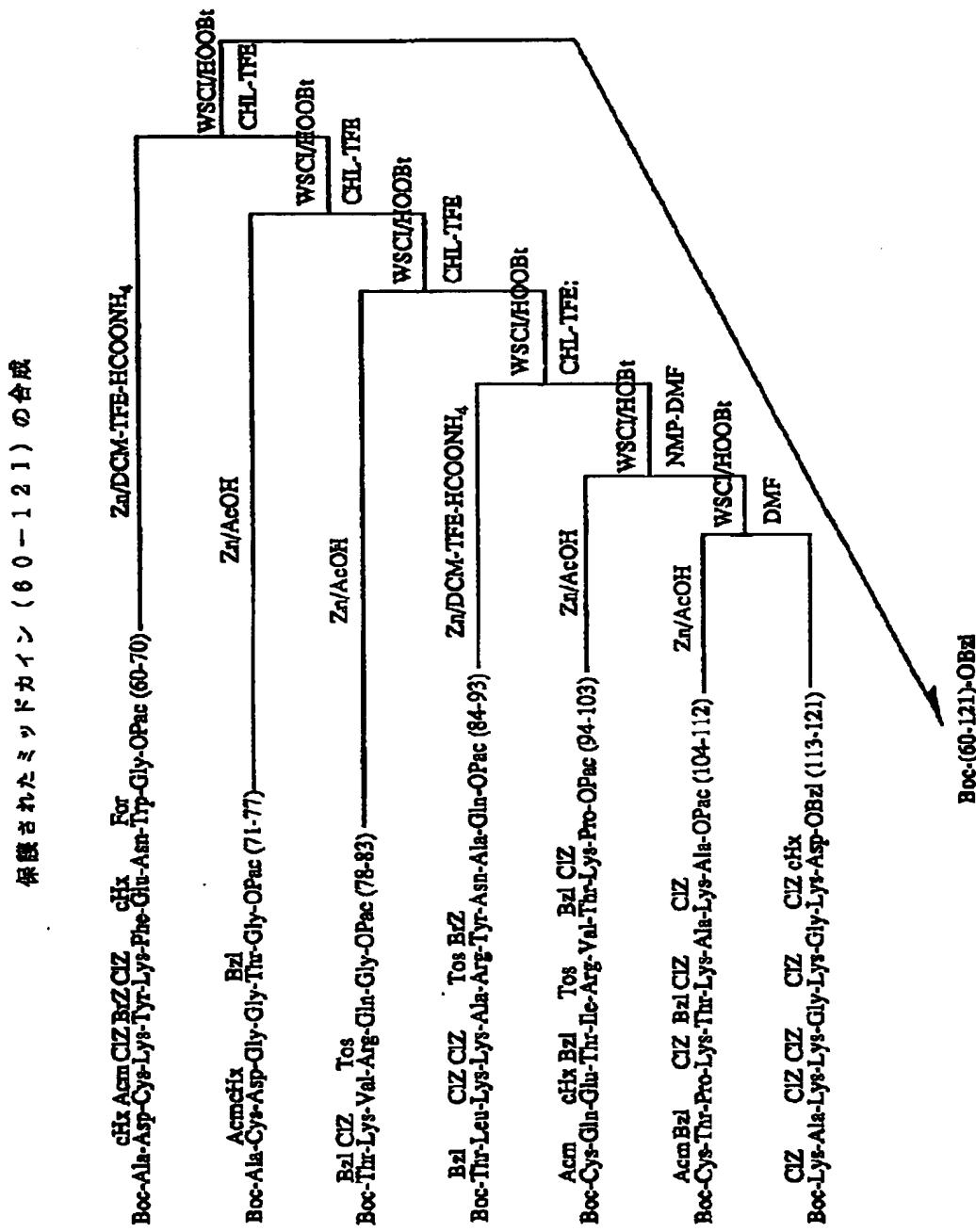
40 【図1】保護されたミッドカイン (1-59) の合成図
【図2】保護されたミッドカイン (60-121) の合成図

【図1】

保護されたニオトカイソ(1-59)の合成



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶
C 0 7 K 14/48
// A 6 1 K 38/00

識別記号 庁内整理番号
8318-4H
AAA
ABS
ACB

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 37/02

ACB

(72) 発明者 村松 翁

愛知県名古屋市天白区天白町大字島田字黒
石3785-3391 シティコーポ しまだ B
-205

(72) 発明者 村松 寿子

愛知県名古屋市天白区天白町大字島田字黒
石3785-3391 シティコーポ しまだ B
-205

(72) 発明者 粟屋 昭

神奈川県横浜市戸塚区矢部町4978